

Studies on the Pathogenesis of Atherosclerosis and Development of Anti-atherogenic Small Molecule Using Gene Targeted Mouse

Jae Hoon Choi, Jung-Ju Hong, Jeong-Jae Kim, Seong-Kyu Park Yun-Jeong Seo, and
Goo Taeg Oh

Genetic Resources Center, KRIBB, Yusong, Daejeon 305-600

동맥경화증이란?

동맥경화(atherosclerosis)는 인류의 오랜 난치병으로 선진화된 나라일수록 더욱 중요시되는 질병이다. 따라서 한국에서도 동맥경화로 인한 심근경색, 뇌졸중 및 심장발작 등은 날로 증가일로에 있다. 현재 알려진 동맥경화의 주요 발생 과정을 살펴보면 혈중콜레스테롤의 주요 전달체인 low density lipoproteins (LDL)이 동맥벽에 혈중농도 의존적으로 전달되며, 동맥벽의 내피하에서 지방성분의 산화가 시작되고 (minimally modified LDL, mm-LDL), 이들이 순환 중의 monocyte를 동맥벽으로 유도하게 됨으로서 시작(initiation)이 된다. 동맥벽에 침윤한 monocytes는 산화된 LDL에 자극 받은 혈관내피세포가 생산한 monocyte-colony stimulating factor (M-CSF)에 의해 macrophage로 분화하고, 이들 세포의 강력한 산화능에 의해 LDL은 완전한 산화 상태(ox-LDL)가 되어 macrophage의 표면수용체인 LDL receptor에 결합하는 능력을 상실하고 대신에 scavenger receptor (SR)를 통하여 macrophage에 수용됨으로써 이들 세포내의 cholesterol 농도를 조절하는 feed-back 조절 메커니즘을 벗어나게 된다 (1). 결과적으로 macrophage에 고농도로 축적된 cholesterol은 소위 foamy cells이 되어 동맥경화의 초기 병변인 지방선조(fatty streak)를 형성한다. 동맥경화 초기 진행에 있어서 macrophage의 역할은 M-CSF가 mutation됨으로서 macrophage가 거의 없는 osteopetrotic (op) mouse에서 동맥경화가 거의 발생하지 않는다는 것을 확인함으로써 증명되었다(2,3). 이러한 초기병변인 지방선조 단계에서 병변의 진행(progression)은 동맥벽 중간층 (medial layer)에 있는 평활근세포가 elastic lamina를 지나 혈관벽 내층 (intima)과 혈관내피세포 하부부분에까지 이동하면서 진행이 된다. 이 평활근세포는 증식을 하거나, modified lipoproteins을 수용하여 foam cell이 되기도 한다(4). 또한 이들 평활근세포는 세포외기질을 합성 분비함으로써 진행된 동맥경화 병변에서 자주 보이는 fibrous cap을 형성하게 된다. 동맥경화의 주요 증상들은 진행된 병변을 가진 동맥에서 일어나는데, 협착증(ischemic symptoms)은 병변이 진행함에 따라서 혈관의 대응능력이 감소되고 결과적으로 혈관내강이 좁아짐으로써 일어나지만, 심근경색(myocardial infarction)이나 심장발작 (stroke)은 plaque의 파열과 그에 따른 thrombosis에 의해서 일어난다. 이같은 증상은 macrophage 및 지질이 많이 침착된 부위에서 주로 일어나며, macrophage 및 평활근세포의 necrosis/apoptosis, macrophage에 의한 세

포기질분해효소의 분비 등에 의해 약화된 plaque의 반복적 파열이 주 원인이 된다(5). 결론적으로 동맥경화의 시작 단계에는 지질의 농도가 높은 것이 주요한 위험인자이며, 병변의 진행단계에서는 macrophage와 T cell의 상호작용으로 이루어지는 광범위한 만성 염증성반응이 병변 진행의 자극 인자라고 할 수 있다. 최근에는 동맥경화증이 혈중 지질의 농도와 무관하게 발생하는 염증성 질환이라고 해석하는 보고도 늘어나고 있다(4). 따라서 동맥경화를 연구하기 위한 모델설정 및 치료제를 개발하기 위한 표적물질도 각 질병의 단계에 따라 달라질 필요성이 대두되고 있다.

왜 마우스인가?

인체를 대상으로 하는 동맥경화 연구는 여러 가지의 한계가 존재하기 때문에 질병의 생물학적인 토대에서 보다 폭넓은 이해 및 가능성 있는 치료법의 테스트와 개발을 위해서는 동맥경화의 유전학적, 환경적 원인들을 연구하기 위한 동물모델의 개발이 필요하다. 현재 토끼, 랫드, 마우스, 돼지, 원숭이 등이 동맥경화 연구의 모델들로 이용되고 있다. 이 중 마우스는 동맥경화 연구에 있어서 많은 장점을 가지고 있다. 마우스는 체구가 작아 다루기가 쉽고, 비교적 값이 저렴하며, 짧은 세대시간을 가진다. 그리고 식이 등을 조절할 경우 비교적 짧은 시간 안에 동맥경화가 발병하며, 마우스의 유전학에 대한 연구가 많이 진행되어 있는 것도 장점이라 하겠다. 또한 체계가 잘 확립된 유전적으로 동일한 근교계 마우스의 경우, 질병에 보다 민감하게 반응하게 하는 유전자를 찾는 데 매우 유용하게 사용할 수 있다. 그러나, 이러한 장점들 이외에도 가장 중요한 점은, 동맥경화 발병을 일으키는 후보 유전자들의 효과를 외래유전자의 도입을 통하여 보거나, 내부 유전자를 제거 (Knock-out)시킴으로써 알 수 있다는 점이다.

동물모델을 이용한 치료제 후보 물질의 개발 및 표적 단백질 발굴

현재 동맥경화 및 그 관련 질환인 심장마비 및 뇌졸중 등의 치료제로서는 statin류의 물질들이 140억 달러 이상의 시장을 형성하고 있으며 매년 고속 성장을 하고 있다. 그러나 장기 복용시의 부작용 등으로 인해 새로운 치료제의 개발에 대한 필요성이 제기 되고 있으며, 동맥경화의 발병원인 및 진행에 관한 생화학적, 분자생물학적 연구가 활발히 진행되어지고 있다. 이러한 연구결과 및 대규모의 역학조사를 통하여 동맥경화가 고지혈증을 의미하는 개념에서 점차 만성염증성 질환의 일종이라는 견해에 많은 사람들이 동의하고 있다. 마우스 동맥경화모델이 없었던 과거에는 고콜레스테롤 식이를 실시한 동맥경화 모델을 이용하여 연구 및 효능평가 등이 이루어졌으나, 1993년 이후 형질전환 기술을 이용한 마우스 동맥경화 모델이 도입된 이후 콜레스테롤의 세포내 및 생체내 대사에 관련된 기전 및 관련된 면역, 생리학적 매개 물질들에 관한 연구가 활발히 이루어짐으로써 동맥경화의 발생기전에 대한 이해가 깊이를 더해가고 있으며, 이를 바탕으로 새로운 치료제의 개발에 초점이 맞추어져 있다. 그러나 아직까지 만족스러운 효능을 가진 동맥경화 치료제가 개발되지 못했고, 기존의 항산화제, 콜레스테롤 생성억제제 등을 대체할 수 있는 신약의 개발에 치열한 경쟁을 벌이고 있다(5).

본 실험실은 apoE^{-/-} 및 Ldlr^{-/-} 마우스를 국내에서 동맥경화의 병리기전 연구에 사용할 수 있도록 확립하였으며, 새로운 동맥경화억제제를 탐색하는데 매우 효과적인 모델동물임을 확인할 수 있

었다. *Ldlr*^{-/-} 마우스에 *Paigen Diet*를 실시할 경우 혈장내에서 *TGF-β*, *IL-1β*, *IL-6*와 같은 *pro-inflammatory cytokine*의 양을 증가시켰으며, 동맥경화 병변에서도 염증과 관련된 인자들을 발현하고 있음을 면역 염색법으로 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구실에서는 *Ldlr*^{-/-} 마우스를 모델로 하여 현재 유럽과 일본을 주축으로 하여 천연물질로부터 유래된 동맥경화 치료제를 후보 물질을 찾는 것과 같은 맥락에서 신약 선도물질에 대한 효능을 검증하여 보았다 (6-8).

동맥경화억제 후보물질인 *hematein*과 *tilianin*을 이용하여 실험한 결과, 혈중지질의 농도에는 커다란 영향을 미치지 않았으나, *Paigen diet*를 실시한 *Ldlr*^{-/-} 마우스에서 죽상경화반의 형성을 억제하는 매우 효과적인 동맥경화 치료제로서의 가능성을 보여주었다. 또한 이러한 결과를 정상동물인 토끼에서 실험을 실시하여 유전자적중동물에서 나타난 결과를 비교 분석하였다. 실험적으로 고콜레스테롤 혈증을 일으킨 토끼에서 대조군, *hematein* 처리군, *probucol* 처리군으로 나누어 8주간 치료 후 희생시켜 얻은 대동맥에서 지방산의 변화를 보았을 때, 대조군에 비해 *hematein* 투여군과 *probucol* 투여군에서 혈중콜레스테롤 농도와는 무관하게 지방산의 형성을 억제하는 것을 알 수 있었다(8). 이러한 연구 결과는 유전자적중동물을 동맥경화의 병리 기전 연구 및 치료후보물질의 검색에 이용할 수 있는 모델로 이용할 수 있는 가능성을 확인하여 주는 중요한 연구 결과라고 할 수 있다.

Hematein 및 *tilianin*의 치료 기전 연구한 결과 현재 동맥경화와 관련성이 매우 높은 *biomarker*로 알려진 내피세포부착물질(*vascular cell adhesion molecule-1*) 및 *pro-inflammatory cytokine*인 *IL-1* 과 *IL-6*의 발현과 생산을 억제함으로써 항동맥경화 효과를 나타내는 것을 입증하였다(6,7). 이러한 유전자 및 단백질의 발현 감소는 동맥경화의 발병에 가장 크게 영향을 미치는 대식세포의 침윤을 억제하고 이들에 의해 생산되는 산화질소의 과대 생산을 억제하게 되어 동맥경화의 진행을 억제하는 것임을 본 연구를 통해서 증명하였다. 세포부착인자, *pro-inflammatory cytokine*, *iNOS* 등 동맥경화의 진행에 중심적인 역할을 하는 유전자들의 발현에 직접적인 영향을 미치는 *nuclear factor*인 *NF-kB*의 활성화에 이들 물질이 미치는 영향을 조사한 결과, *hematein*이 *NF-kB*의 활성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 보면, *hematein*은 유전자발현조절인자인 *NF-kB*의 활성을 억제하여, 이와 관련된 세포부착인자 등의 유전자 및 단백질의 발현을 억제하는 기전으로 항 동맥경화 효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

동맥경화의 새로운 *biomarker* 및 치료제 후보물질의 표적 단백질을 발굴하기 위하여, 본 연구팀은 정상 식이와 고지질 식이를 급여한 *Ldlr*^{-/-} 마우스의 흉대동맥에서 *RNA*를 획득하여 *DDRT-PCR*을 실시하고, 동맥경화와 관련이 있는 장기 조직에서 프로테오믹스 기법을 적용하고 있다. 현재 동맥경화 발생과 관련된 유전자들을 찾아서 염기서열을 결정하고 최종 18개의 *clone*의 유전자들에 우선 순위를 정하여 형질전환 동물을 제작하고 있으며, 혈청, 심장, 동맥조직 등에서 프로테오믹스를 분석하고 있다.

궁극적으로 마우스 모델에서 해결하여야 하는 문제는 “어떻게 마우스에서 찾아낸 동맥경화에 대한 정보들을 사람에게 적용할 것인가?”라는 질문에 해답을 구하는데 있다고 할 수 있다. 이러한 질문에 대한 답변을 구하기 위한 일환으로 *Rubin* 과 *Smith*는 사람에서의 역학조사 결과를 토대로 마우스의 유전자를 변형시켜 얻은 결과들을 토대로 사람에서의 결과를 예측하였다. 총 7경우가 비교되었는데, 마우스의 실험 결과가 사람에서의 병리현상과 정확하게 일치하는 것을 볼 수 있었다(9). 이와 같

은 분자 유전학적인 연구를 통한 유전자의 기능연구 뿐만 아니라, 식이, 약물, 사회적 스트레스 등이 인체의 동맥경화 병변형성에 어떤 역할을 하는지 예측할 수 있는 동물모델로 이용될 수 있으며, 새로운 약물을 개발하기 위한 표적 단백질을 찾고, 치료제 후보 물질의 효능을 검증하는 모델로 사용이 가능하다. 결론적으로 마우스는 동맥경화 연구에 있어서 매우 유용한 시스템이라고 할 수 있다.

REFERENCES

1. Chawla A., Boisvert W. A., Lee C.-H., Lafitte B. A., Barak Y., Joseph S. B., Liao D., Nagy L., Edwards P. A. and Curtiss L. K. et al. A PPAR-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell* 2001; 7:161-171.
2. Qiao J. H., Tripathi J., Mishra N. K., Cai Y., Tripathi S., Wang X. P., Imes S., Fishbein M. C., Clinton S. K., Libby P., Luis A. J. and Rajavashisth T. B. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteoporotic mice. *Am. J. Path.*, 1997; 150:1687-1699.
3. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux D, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor(op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8264-8.
4. Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *New Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
5. Glass CK and Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell* 2001; 104: 503-516.
6. Jung-Joo Hong, Tae-Sook Jeong, Jae-Hoon Choi, Jae-Hak Park, Kun-Young Lee, Yun Jeong Seo, Sei-Ryang Oh and Goo Taeg Oh. Hematein Inhibits Tumor Necrotic Factor- α -Induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Nuclear Factor- κ B Dependent Gene Expression in Human Vascular Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 281(5):1127-1133, 2001.
7. Jung-Joo Hong, Jae Hoon Choi, Sei Ryang Oh, Hyeong Kyu Lee, Jae Hak Park, Kun-Yeong Lee, Jung-Jae Kim, Tea-Sook Jeong. Goo Taeg Oh. Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. *FEBS Letters.* 495(3):142-7, 2001.
8. Goo Taeg Oh, Jae Hoon Choi, Jung Joo Hong, Dae Yong Kim, Sae-Bom Lee, Chul-Ho Lee, Ju-Ryoung Kim, Byung-Hwa Hyun, Sei Ryang Oh, Song-Hae Bok, Tea-Sook Jeong. Dietary Hematein Inhibit Development of Fatty Streak Lesions in the Rabbit. *Artherosclerosis* 159(1):17-26, 2001.
9. Rubin EM, Smith DJ. Atherosclerosis in mice: getting to the heart of a polygenic disorder. *Trends Genet* 1994; 10: 199-203.